

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS**

LIA DRAGO RIGUETTE BROSEGHINI

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ATIVIDADE DA
HISTONA DEACETILASE E DA DNA METILTRANSFERASE EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO
MATERNA**

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2020

LIA DRAGO RIGUETTE BROSEGHINI

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ATIVIDADE DA
HISTONA DEACETILASE E DA DNA METILTRANSFERASE EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO
MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gislaine Zilli Réus
Coorientador: Prof^o. Dr^o. João Luciano de Quevedo

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B874e Broseghini, Lia Drago Riguetto.

Efeitos do enriquecimento ambiental na atividade da histona deacetilase e da DNA metiltransferase em ratos machos e fêmeas submetidos à privação materna / Lia Drago Riguetto Broseghini. - 2020.

50 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Gislaine Zilli Réus.

Coorientação: João Luciano de Quevedo.

1. Epigenética. 2. Privação materna. 3. Transtorno depressivo maior. 4. Enriquecimento ambiental. I. Título.

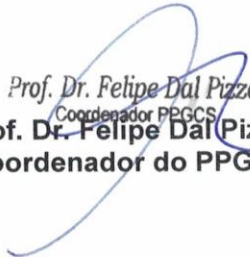
CDD 23. ed. 616.89



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 343

Com início às 17h (dezessete horas) do dia onze de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **LIA DRAGO RIGUETTE BROSEGHINI** sob a orientação da **Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus** intitulada **“EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ATIVIDADE DA HISTONA DEACETILASE E DA DNA METILTRANSFERASE EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Karen Jansen (Universidade Católica de Pelotas - UCPEL) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 18h (dezoito horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte).


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS


Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional, pertencente ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

*Dedico esse trabalho aos meus amores
e maiores incentivadores nesta jornada:
Marido Neacil, filho Miguel,
Pai Pedro, Mãe Marineti e irmã Pietra.*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio incondicional, sem o incentivo deles este caminho seria mais difícil! Meu marido Neacil, companheiro de todas às horas, o qual me motiva a cada dia e meu filho, meu pequeno, amor incondicional e motivação maior. A meus pais, Marineti e Pedro exemplos de garra, estudos perseverança e reconstrução. A minha irmã que mesmo morando no exterior no momento sempre está presente na minha vida, me ajudando e incentivando.

A minha orientadora Prof. Dr^a. Gislaine Zilli Réus pelo carinho, conhecimento, apoio, garra, presença constante, incentivo e paciência. Ao meu Coorientador Prof^a. Dr. João Luciano de Quevedo pela oportunidade e confiança.

Aos colegas mestrandos, doutorandos e alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Psiquiatria Translacional, em especial grupo de estudo em Depressão, pela dedicação constante e, que sem os quais, esse trabalho não poderia ser realizado. A Prof. Dr^a. Samira da Silva Valvassori e seu grupo pela análise dos parâmetros epigenéticos.

Aos meus colegas mestrando em Ciências da Saúde do MINTER 2019/2020 pelo companheirismo em toda essa nossa caminhada, viagens, trabalhos e aulas.

Aos professores da instituição que se deslocaram para ministrar excelentes aulas, de grande proveito e utilizada na execução deste trabalho. Aos funcionários do PPGCS por sempre nos deixar atualizados nos cronogramas institucionais e funcionários do bloco R e S pela receptividade e educação nas idas a instituição.

Obrigada!

*“ O oposto da depressão não é
felicidade, mas vitalidade.”*

Andrew Solomon

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina (sigla do inglês)
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (sigla do inglês)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEI	Estresse de Imobilização Crônica (sigla do inglês)
CFTR	Fibrose Cística Regulador de Condutância Transmembranar
CORIN	Corina, Serina Peptidase
CpG	Ilha Citosina-Fosfatoguanina
DNMTs	DNA Metiltransferase
DTT	Ditiotreitol
EA	Enriquecimento Ambiental
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ECM	Estresse Crônico Moderado
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico (sigla do inglês)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (sigla do inglês)
GR	Receptores de glicocorticoides (sigla do inglês)
HAT	Histona Acetiltransferase
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
HDAC	Histona Deacetilase
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IFN-c	Interferon-c
NAc	Núcleo Accumbens
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico (sigla do inglês)
ONOO-	Peroxinitrito (sigla do inglês)
PFC	Córtex Pré-frontal
PM	Privação Materna
RNAnc	RNA não codificante

SNC	Sistema Nervoso Central
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α (sigla do inglês)
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular (sigla do inglês)
5-mC	5-metilcitosina
5-HTT	Proteína Transportadora de Serotonina

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno mental altamente debilitante e uma doença que tem um alcance global, afetando pessoas de todas as idades, raças e condições econômicas. Embora numerosos estudos tenham avançado na compreensão da fisiopatologia do TDM e na busca por terapias eficazes, os tratamentos ainda estão longe do ideal e uma grande porcentagem de pacientes é refratária a estratégias farmacológicas e outras formas de tratamento. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de um enriquecimento ambiental (EA) em ratos Wistar machos e fêmeas privados dos cuidados maternos. A privação materna (PM) foi realizada nos 10 primeiros dias de vida, durante 3 horas/dia. Após o desmame no 21º dia os animais foram divididos em 3 grupos: 1) controle; 2) privados sem EA; e 3) privados com EA. O EA foi aplicado durante três horas diárias, até os animais atingirem 61 dias de vida. A atividade da enzima histona deacetilase (HDAC) e a atividade da enzima DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (CF) e hipocampo foram avaliados nos dias 31, 41 e 61 em todos os grupos. Em fêmeas de 31 dias a atividade da HDAC e DNMT aumentou no CF e no hipocampo do grupo privado. Em fêmeas de 41 dias houve um aumento da HDAC e DNMT no CF e hipocampo do grupo privado, porém, nas fêmeas expostas ao EA por 20 dias ocorreu uma diminuição da HDAC no hipocampo e da DNMT no CF e hipocampo. Em fêmeas de 61 dias submetidas a PM houve um aumento da HDAC e DNMT tanto no CF quanto no hipocampo. Entretanto, a exposição das fêmeas ao EA por 40 dias foi capaz de reverter essas alterações. Nos ratos machos de 31, 41 e 61 dias submetidos a PM as atividades da HDAC e DNMT aumentaram no hipocampo e somente no grupo exposto ao EA por 40 dias ocorreu diminuição da atividade no hipocampo. No CF dos machos de 61 dias submetidos a PM e ao EA por 40 dias houve uma redução de ambas HDAC e DNMT. Em conclusão, a PM induziu alterações epigenéticas que persistiram ao longo da vida e tais efeitos foram mais evidentes em ratos fêmeas do que machos. Além disso, um EA pode ser considerado uma importante estratégia não-farmacológica para prevenir ou reverter alterações de longo prazo induzidas por traumas no início da vida.

Palavras-Chave: Epigenética, privação materna, enriquecimento ambiental, transtorno depressivo maior.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a highly debilitating mental disorder and a disease that has a global reach, affecting people of all ages, races and economic conditions. Although numerous studies have advanced in understanding the pathophysiology of MDD and the search for effective therapies, treatments are still far from ideal and a large percentage of patients are refractory to pharmacological strategies and other forms of treatment. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of environmental enrichment (AE) on male and female Wistar rats deprived of maternal care. Maternal deprivation (PM) was performed in the first 10 days of life for 3 hours / day. After weaning on the 21st day the animals were divided into 3 groups: 1) control; 2) deprived without EA; and 3) deprived with EA. The EA was applied for three hours daily, until the animals reached 61 days of life. Histone deacetylase (HDAC) enzyme activity and DNA methyltransferase (DNMT) enzyme activity in the frontal cortex (CF) and hippocampus were evaluated on days 31, 41 and 61 in all groups. In 31-day-old females, HDAC and DNMT activity increased in the CF and hippocampus of the private group. In females of 41 days there was an increase of HDAC and DNMT in the CF and hippocampus of the private group, but in females exposed to EA for 20 days there was a decrease of HDAC in the hippocampus and DNMT in CF and hippocampus. In 61-day-old females submitted to PM there was an increase in HDAC and DNMT in both FC and hippocampus. However, exposure of females to AE for 40 days was able to reverse these changes. In male rats at 31, 41 and 61 days submitted to PM, HDAC and DNMT activities increased in the hippocampus and only in the group exposed to AE for 40 days there was a decrease in hippocampal activity. In CF of 61-day-old males submitted to PM and AE for 40 days there was a reduction of both HDAC and DNMT. In conclusion, PM induced lifelong persistent epigenetic changes and such effects were more evident in female than male rats. In addition, an AS can be considered an important non-pharmacological strategy to prevent or reverse long-term trauma-induced early life changes.

Keywords: Epigenetics, maternal deprivation, environmental enrichment, major depressive disorder.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	22
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	22
4.3	PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA	22
4.4	PROCEDIMENTO DE EXPOSIÇÃO AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA)	23
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	24
4.5.1	Avaliação da atividade das HDACs e das DNMTs	24
4.5.1.1	Extração nuclear.....	24
4.5.1.2	Atividade das HDACs e das DNMTs	25
4.5.2	Dosagem de Proteínas	25
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
5	RESULTADOS	26
5.1	EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA HDACS EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNA	26
5.2	EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA HDACS EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA.....	27
5.3	EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA DNMT EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNA	28
5.4	EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA DNMT EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA.....	30
6	DISCUSSÃO	32
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9	ANEXOS	50
9.1	ANEXO I - CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DO CEUA... ..	50

1 INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um mal que tem acometido um número cada vez maior de indivíduos ao redor do mundo, fato que tem preocupado autoridades médicas, psicólogos e cientistas, bem como os gestores econômicos, devido a perdas altamente significativas nos campos empresariais.

Por mais que se tenha avançado nas descobertas sobre como o cérebro humano funciona, a compreensão dos mecanismos que podem induzir o TDM, como uma doença crônica, debilitante e mesmo incapacitante sobre o perfil de indivíduos proativos, tem representado um enigma que pode ser considerado como o maior desafio posto na atualidade para as ciências médicas psiquiátricas e as ciências psicológicas.

O TDM é líder na causa de incapacidade (Ferrari et al., 2013). No Brasil a prevalência do TDM é de aproximadamente 10,2% na população adulta (Fujii et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019), mais de 300 milhões de pessoas no mundo sofrem de TDM independentemente da idade. Quando duradoura e com intensidade moderada ou grave, o TDM pode tornar-se um problema grave de saúde, podendo levar o indivíduo afetado ao suicídio. De fato, estima-se que cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio todos os anos. Deste número, não há como determinar quais sofrem com sintomas variados de depressão, no entanto, o que se sabe é que o suicídio é a segunda principal causa de morte entre jovens com idade entre 15 a 29 anos (WHO, 2019).

O TDM tornou-se um importante problema global de saúde pública, especialmente por causa da prevalência relativamente alta ao longo da vida, variando em um percentual de 2% a 15% e por estar associado com uma substancial perda de vontade emocional (Ustun, Chatterji, 2001; Ustun et al., 2004). De acordo com a OMS (WHO, 2019), dependendo do número e da gravidade dos sintomas, um episódio depressivo pode ser classificado como leve, moderado ou grave. Um indivíduo com um episódio depressivo apresentará dificuldades em seu trabalho comum e atividades sociais, mas provavelmente não deixará de funcionar completamente. No episódio depressivo grave, é muito improvável que o doente possa continuar com atividades sociais, profissionais ou domésticas, exceto em um grau muito limitado.

Segundo Coryell e Winokur (2019) o TDM provoca disfunções cognitivas, distúrbios de ordem psicomotora, e ainda, distúrbios de outros tipos, como: sintomas

de ansiedade, fadiga, perda do desejo sexual, anormalidades no apetite, anedonia, distúrbios do sono, dificuldades de concentração, sentimentos de culpa ou baixa autoestima e humor deprimido. A depressão também pode ser encontrada em pessoas que tenham ou não episódios maníacos e que apresentam sintomas crônicos com frequentes recaídas quando não tratados ou não aderem ao tratamento, seja ele farmacológico ou terapêutico. O TDM envolve episódios depressivos repetidos e durante esses episódios, a pessoa experimenta humor deprimido, perda de interesse e prazer, e reduz a energia levando a atividade diminuída por pelo menos duas semanas (WHO, 2019). Para critério diagnóstico o paciente deve apresentar humor deprimido e/ou anedonia por pelo menos duas semanas constantes e outros sintomas físicos ou emocionais, como alterações no sono e no apetite (Nestler et al., 2002).

A fisiopatologia do TDM ainda não está totalmente esclarecida, sendo este um transtorno complexo e heterogêneo, embora os eventos estressantes da vida sejam um fator importante na vulnerabilidade da doença. Pesquisas vêm mostrando que esta envolve diversos mecanismos biológicos tanto no sistema nervoso central (SNC) como em outros sistemas fisiológicos (Verdujin, 2015). Uma de suas etiologias é a hipótese monoaminérgica atribuída ao déficit de neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica, como a serotonina, a noradrenalina e a dopamina (Delgado, 2006; Schildkraut, 1995. Berton e Nestler, 2006). Os fármacos antidepressivos são usados para aumentar essas monoaminas na fenda sináptica, porém, aproximadamente 30% dos pacientes sofrem remissão após o primeiro tratamento e cerca de 50% dos pacientes não respondem aos antidepressivos monoaminérgicos (Réus, et al 2017). Como a respostas a estes medicamentos não são muito eficazes, muitos estudos vêm propondo que outras vias estão relacionadas com a neurobiologia do TDM (Abelaira et al., 2014, Reus et al., 2015 e Mocking et al., 2017).

Pesquisas destacam o papel de outros sistemas de neurotransmissores, como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Réus et al., 2015). Segundo Ignácio et al. (2017), uma série de novos estudos mostram que outras vias envolvidas com a neuroplasticidade ou sinais intracelulares que regulam a expressão de genes envolvidos na sobrevivência de células neuronais podem ser importantes alvos no tratamento e fisiopatologia do TDM.

O sistema imunológico também desempenha um importante papel na fisiopatologia do TDM (Abelaira et al., 2014, Réus et al., 2015 e Mocking et al., 2017).

A relação do sistema imune com a fisiopatologia do TDM é evidenciada pelo fato de que pacientes com doenças inflamatórias como diabetes, doenças cardiovasculares, metabólicas e asma, apresentam maiores chances de desenvolverem o TDM. Pacientes com este diagnóstico apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) IL-8, IL-12, interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), (Schiepers et al., 2005; O'brien et al., 2007). Níveis elevados desses fatores inflamatórios no SNC estão relacionados aos sintomas de estresse e TDM (Menard et al. 2017). Song et al. (2009) mostraram aumento de IL-1 β sérica e diminuição dos níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória) em pacientes deprimidos. Vale ressaltar que citocinas pró-inflamatórias foram reduzidas a níveis normais após 12 semanas de tratamento com antidepressivos (Dahl et al., 2014).

Embora não seja bem conhecida, a hipótese da inflamação pode estar relacionada a uma das causas do TDM, visto que emerge de alterações nos reguladores imunitários do SNC, que são ativados como respostas a agentes infecciosos e ou inflamatórios. Isso acontece através de interações diretas entre neurônios e células gliais (Réus et al., 2015). Neurônios e microglia interagem bidirecionalmente e se comunicam através de uma quimiocina que é expressa por neurônios e atua através de seu receptor, CX3CR1, o qual está presente exclusivamente em células microgliais (Xanthos e Sandkuhler, 2014).

Microglias são células do SNC que são ativadas em respostas a um dano tecidual ou infecções cerebrais (Stertz et al., 2013). Essas células possuem várias funções, as quais incluem reconhecimento de patógenos, fagocitose, apresentação de antígenos, remodelação sináptica, entre outros. A resposta imune central é modulada por microglia e astrócitos (Réus et al 2015). De importância, Steiner et al. (2008) não encontrou nenhuma evidência de ativação microglial em áreas cerebrais de pacientes com TDM, mas foi encontrada em pacientes que cometeram suicídio, sugerindo que a ativação microglial pode ser uma consequência do estresse pré-suicida.

Quando o cérebro sofre alterações em sua plasticidade, ele pode ficar mais suscetível ao estresse por interrupção das interações gliais ao nível da sinapse. De fato, a hiper-ramificação microglial e a atrofia de astrócitos no córtex pré-frontal acontecem pela exposição ao estresse crônico (Tynan et al., 2013). No entanto, em um estado inflamatório, as células residentes do cérebro, como os neurônios, a

microglia e os astrócitos, recebem mediadores onde sinalizam para aumentar a expressão de genes associados à inflamação e ao comprometimento da sinalização neuroendócrina (Menard et al. 2017). Este aumento inflamatório também pode levar a um aumento em biomarcadores de estresse oxidativo. Este estresse é compreendido como um desequilíbrio nas espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas antioxidantes no qual resulta em danos nas biomoléculas (Réus et al., 2015).

A geração de EROs constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, a produção excessiva pode conduzir a um desbalanço entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes, culminando em danos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Shami e Moreira, 2004).

O estresse oxidativo é um dos grandes vilões envolvidos em diversos mecanismos do SNC, como no aumento de morte celular, na redução da plasticidade neuronal e neurogênese (Floyd, 1999; Shukla et al., 2011; Moylan et al., 2013). O aumento de EROs também pode interagir de forma prejudicial com o aumento de óxido nítrico (NO), pois a formação do peroxinitrito (ONOO-) pode culminar na nitração de proteínas e neurotoxicidade (Calabrese et al., 2007).

O cérebro é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo e nitrosativo porque tem alta taxa metabólica (Maes et al., 2011) e, consequentemente, alta taxa de consumo de oxigênio (Che et al., 2015), acoplados a menores níveis médios de antioxidantes (Maes et al., 2011). Além disso, o cérebro é altamente vulnerável à peroxidação lipídica devido à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas neuronais (Valko et al., 2007). O estresse oxidativo elevado também foi encontrado em tecido cerebral de ratos adultos após indução do protocolo de privação materna (Réus, et al., 2015).

Evidências genéticas apontam um comprometimento mitocondrial em pacientes com depressão (Streck et al., 2014). Magarinos et al. (1999) verificaram que o estresse não afetou o número de mitocôndrias neuronais, porém, a área mitocondrial aumentou após um paradigma de estresse, sugerindo que uma maior duração do estresse poderia comprometer a síntese de ATP. Gardner et al. (2008) evidenciaram que houve uma diminuição da produção de ATP mitocondrial e uma diminuição de

enzimas mitocondriais no músculo de pacientes com TDM. Madrigal et al. (2001), relataram que os complexos I-III e II-III da cadeia respiratória mitocondrial foram inibidos no cérebro de ratos expostos a estresse crônico. Rezin et al. (2008), relataram que os complexos da cadeia respiratória mitocondrial I, III e IV foram inibidos no córtex cerebral e cerebelo de ratos após 40 dias de estresse crônico moderado (ECM), e este efeito foi revertido após a administração de cetamina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

Outro neurotransmissor do SNC envolvido na fisiopatologia do TDM é o glutamato. A expressão dos transportadores de glutamato tem relação direta com a neurotoxicidade microglial (Piani et al., 1992; Barger; Basile, 2001). A expressão dos transportadores de glutamato é diminuída através das citocinas inflamatórias e, estas são capazes de aumentar a liberação de glutamato pelos astrócitos (Miller, 2013). Além disso, as citocinas inflamatórias ativam a microglia que, conseqüentemente, pode induzir a liberação de glutamato que contribui com o dano neuronal durante a neuroinflamação, gerando um ciclo vicioso (Barger et al., 2007).

Estudos experimentais e clínicos têm evidenciado perda neuronal e atrofia cerebral como resultado de estresse e depressão. As áreas que mais sofrem os efeitos do estresse são o hipocampo, principalmente as áreas piramidais CA3 (Sapolsky, 1996) e o córtex pré-frontal (Drevets et al., 1997; Duman et al., 1999; Abdallah et al., 2016).

Entre os diversos mecanismos neurais, a função de neurotransmissores, além dos monoaminérgicos, como também, mecanismos celulares de ação, fatores neurotróficos e plasticidade neuronal, de acordo com a evolução das pesquisas, parecem formar um conjunto importantíssimo de mecanismos para a compreensão da fisiopatologia do TDM.

Como a fisiopatologia do TDM é bastante discutida e ampla, para ser mais bem compreendida muitos laboratórios usam modelos animais com intuito de encontrar novas estratégias terapêuticas. Um dos protocolos adotados é a separação de filhotes das mães no início da vida, o que caracteriza a indução de experiências adversas que tem demonstrado possibilidades de conduzir a alterações comportamentais de longo prazo (Haller et al., 2014). Essa negligência e a privação social podem estar relacionadas ao desenvolvimento do TDM (Kaplow; Widom, 2007).

O estresse induzido por privação materna em roedores, foi proposto por Levine et al. (1956), com objetivo de comparar os efeitos de longa duração que ocorrem em

peessoas que sofreram estresse traumático na infância, como abandono, negligência de cuidados, abuso sexual, entre outros eventos estressantes. Muitos estudos vêm utilizando o modelo com o objetivo de avaliar alterações comportamentais e mecanismos biológicos envolvidos no TDM. Um aspecto de fundamental importância é o fato de que o estresse no início da vida parece estar envolvido na pobre resposta a tratamentos antidepressivos, tanto em humanos (Nanni et al., 2012; Williams et al., 2016), quanto em animais submetidos ao protocolo de privação materna (Zhang et al., 2015). Portanto, o protocolo de privação materna torna-se importante para o estudo de características biológicas e procedimentos terapêuticos direcionados a terapias mais efetivas a pacientes com depressão resistente a tratamentos (TRD).

Estudos demonstram que a privação dos cuidados maternos durante os dez primeiros dias de vida em roedores induz um comportamento do tipo depressivo na vida adulta (Réus et al., 2011). Em roedores, a separação materna longa imita a perda de pais em seres humanos, e tem sido apresentada como um dos fatores de estresse natural mais potente durante o desenvolvimento (Anisman et al., 1998).

O período pós-natal precoce é caracterizado pela considerável plasticidade do desenvolvimento do sistema nervoso. As primeiras experiências adversas da vida representam um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais como o TDM. Sendo assim, o ambiente após nascimento precoce influencia diretamente no comportamento adulto (Abelaira et al., 2013). Exposições precoces ao desenvolvimento podem ter impactos mais amplos na epigenética e nos circuitos cerebrais do que exposições semelhantes mais tarde na vida (Nestler et al., 2015).

Estudos mostram que o TDM é apenas 40% hereditário, o que enfatiza o envolvimento de fatores não genéticos (Nestler et al., 2015). Estresse severo e prolongado é o principal fator ambiental que leva ao aparecimento do TDM, ansiedade e disfunções cognitivas. Por outro lado, a exposição ao ambiente enriquecido induziu aumento de plasticidade no cérebro e melhorou a aprendizagem e a memória em vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Ratos estressados expostos ao enriquecimento ambiental (EA) tiveram uma redução no comportamento depressivo e ansioso, além de uma melhora na memória espacial (Shilpa et al., 2017).

Os mecanismos epigenéticos podem modelar a interação entre os fatores do meio ambiente e o genótipo dos indivíduos, o que pode levar a transtornos de humor, sendo estes, mecanismos ideais para o estudo de síndromes psiquiátricas (Kinally et al., 2010).

Visto que os pacientes depressivos não apresentam muita adesão ao tratamento farmacológico, e cerca de 30 a 50% dos pacientes não respondem a nenhum dos antidepressivos clássicos (Krishnan; Nestler, 2008). O EA tem apresentando bons efeitos na melhora de déficits cognitivos e comportamentos ansiosos presentes no TDM, assim o EA poderia ser uma boa estratégia para o tratamento do TDM, melhorando as alterações neurobiológicas induzidas pela privação materna, incluindo alterações epigenéticas.

A epigenética é o estudo de alterações hereditárias na expressão de genes, as quais não envolvem alterações nas sequências de DNA (Wolffe e Matzke, 1999). Os fenômenos epigenéticos podem explicar a regulação de genomas pelo meio ambiente e a relação dos fatores ambientais no início da vida com os efeitos fenotípicos que ocorrem ao longo da vida (Lutz e Tureckl, 2014).

A epigenética inclui três processos bastante conhecidos e estudados: metilação de DNA, modificações pós-translacionais em proteínas histonas e alteração de RNA não codificante (RNAnc) (Lister et al., 2009; Lutz e Turecki, 2014).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metil na posição 5' para um resíduo citosina, através de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (Jones e Takai, 2001), principalmente quando a citosina é seguida por uma guanina com uma ligação fosfodiéster, uma sequência denominada de ilha citosina-fosfatoguanina (CpG) (Lister et al., 2009). Essas ilhas CpG são muitas vezes localizadas próximas a uma região promotora de transcrição genética (Bird, 1986). A metilação aumentada de citosinas nas ilhas CpG está associada com transcrição genética reduzida (Jones e Takai, 2001). A metilação do DNA desempenha um papel fundamental na diferenciação celular e inativação cromossômica, sendo vista como uma mudança epigenética mais estável (Nestler et al., 2015).

A acetilação promove a descondensação da cromatina e aumenta a atividade do gene, negativamente a carga positiva de resíduos da lisina nas caudas de histonas, aumentando o espaçamento entre os nucleossomos (Nestler et al., 2015). A acetilação de resíduos de lisina nas histonas reduz a afinidade entre as proteínas e o DNA, promovendo um relaxamento da estrutura da cromatina e aumentando o recrutamento, a estabilização e a ativação da maquinaria transcrricional (Marmorstein e Trievel, 2009). Os níveis de acetilação ao longo da cromatina são determinados pelo balanço entre as enzimas histona acetiltransferase (HAT), a qual adiciona grupos acetil, e histona deacetilase (HDAC), a qual remove os grupos de acetil de resíduos

de lisina nas histonas (Kuo e Allis, 1998). O balanço entre as atividades das enzimas HAT e HDAC determina o estado de acetilação, que por sua vez, influencia o nível de expressão do gene subjacente (Kouzarides, 2007).

Mecanismos epigenéticos podem moderar os riscos ambientais e genéticos para transtornos de humor (Kinnally et al., 2010). Alguns estudos têm mostrado que a privação dos cuidados maternos leva a alterações genéticas até a vida adulta. Ratos que receberam poucos cuidados maternos desenvolveram comportamentos dos tipos depressivos e ansiosos (Weaver et al., 2004). Interessantemente inibidores de HDAC diminuíram a metilação do DNA, e reduziram os comportamentos de depressão e ansiedade desses animais (Weaver et al., 2004). Um estudo também mostrou que o estresse por privação materna desencadeou um aumento da atividade de HDAC no núcleo accumbens de ratos adultos, paralelamente a um aumento de comportamento do tipo depressivo (Réus et al., 2013). Em humanos, vítimas de suicídio e com histórico de abuso sexual na infância, também foi demonstrado um aumento na metilação do DNA (Mcgowan et al., 2009).

Neste sentido, esses novos estudos têm sugerido que a cromatina é um importante substrato para alterações de longa duração relacionadas ao estresse e tratamento com antidepressivos. Os mecanismos pelos quais o estresse ambiental leva a alterações na cromatina ainda não foram elucidados. No entanto, estudos têm sugerido que manipulações farmacológicas são capazes de remodelar a cromatina e podem constituir novos alvos para o desenvolvimento de antidepressivos (Renthall e Nestler, 2008).

Estudar os mecanismos epigenéticos nas doenças mentais é entender como o meio ambiente interage com as experiências de vida de um indivíduo para estabelecer mudanças estáveis em locos genômicos precisos, que então, controlam os níveis de expressão gênica ou indutibilidade. Juntos, esta ligação de genes e ambiente através de mecanismos epigenéticos determinam a vulnerabilidade desse indivíduo a desenvolver transtornos psiquiátricos ao longo da vida (Nestler et al., 2015).

Desta forma, as abordagens epigenéticas prometem avanços na compreensão, diagnóstico e tratamento de doenças psiquiátricas.

Por essa razão, o presente estudo tem como objetivo identificar essas marcas epigenéticas em roedores privados dos cuidados maternos em diferentes fases de seu neurodesenvolvimento.

2 JUSTIFICATIVA

O TDM apresenta uma natureza heterogênea e tem gerado hipóteses difíceis de elucidar. Sua fisiopatologia não é totalmente compreendida, havendo necessidade de estudos com modelos animais. Um dos modelos utilizados é o de privação materna. A privação materna realizada durante os (10) dez primeiros dias de vida em roedores induz o comportamento do tipo depressivo na vida adulta (Réus et al. 2014). De maneira translacional, a privação materna imita a perda dos pais em seres humanos, e tem sido apresentada como um dos fatores de estresse natural mais potente durante o desenvolvimento (Anisman et al., 1998).

Sabe-se que a etiologia do TDM não é somente de herança genética, este além de outros fatores, pode ser desencadeado por influências ambientais como estresse severo e prolongado levando a distúrbios de ansiedade, disfunções cognitivas e alterações epigenéticas. Os mecanismos epigenéticos podem moderar a interação entre os fatores do meio ambiente e o genótipo dos indivíduos, o que pode levar a transtornos de humor (Kinally et al., 2010).

A adesão e aceitação aos tratamentos farmacológicos com antidepressivos em pacientes diagnosticados com TDM são baixas, com aumento demasiado de pacientes refratários, gerando maior necessidade de pesquisas para busca de novos tratamentos (Réus, et al 2017).

A exposição a um enriquecimento ambiental (EA) é uma das terapêuticas propostas para o tratamento do TDM. Verificou-se em estudos que o EA induziu aumento de plasticidade no cérebro e melhorou a aprendizagem e a memória em vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Ratos estressados expostos ao EA tiveram uma redução no comportamento depressivo e ansioso, além de uma melhora na memória espacial (Shilpa et al., 2017).

Para avaliação desses parâmetros é de extrema importância a realização de pesquisas. A causa do TDM ainda não é totalmente conhecida, portanto, novos fatores que desencadeiam este transtorno podem auxiliar de forma mais eficaz o tratamento para indivíduos afetados. Assim, este estudo teve como base estudar possíveis alterações epigenéticas em diferentes fases do neurodesenvolvimento de animais submetidos à privação materna e investigar os efeitos do EA como fator protetor dessas alterações.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar parâmetros epigenéticos em diferentes fases do desenvolvimento de ratos submetidos a privação materna e expostos ao enriquecimento ambiental (EA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade da enzima histona deacetilase (HDAC) no córtex frontal e hipocampo em diferentes fases do desenvolvimento de ratos submetidos a privação materna e expostos ao EA;

Avaliar a atividade da enzima DNA metiltransferase (DNMTS) no córtex frontal e hipocampo em diferentes fases do desenvolvimento de ratos submetidos a privação materna e expostos ao EA.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob protocolo número 070/2018-1 (ANEXO I).

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo foi utilizado um total de 144 ratos Wistar machos e fêmeas, os quais foram submetidos ao protocolo de privação materna (PM) ou não (grupo controle). As ratas grávidas foram fornecidas pelo Biotério da UNESC. Durante todos os procedimentos os animais foram mantidos em condições padrões do biotério. Para o protocolo de PM, os filhotes ficaram separados da mãe 3 horas por dia, durante os primeiros 10 dias de vida. Enquanto isso, os animais do grupo controle permaneceram sob os cuidados maternos integralmente. O desmame ocorreu no 21º dia e então os animais foram novamente divididos em novos grupos experimentais: 1) não privado (controle); 2) privado + sem EA; e 3) privado + EA. Grupos individuais de ratos (machos e fêmeas) foram avaliados em diferentes períodos do desenvolvimento, nos dias 31, 41 e 61, sendo $n = 08$ animais por grupo para cada fase do desenvolvimento, ($n=8$ para machos e $n=8$ para fêmeas). Nas diferentes fases do desenvolvimento e nos diferentes grupos experimentais foram realizados testes epigenéticos como descrito na metodologia.

4.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA (PM)

O protocolo de PM constitui em retirar a mãe da caixa original e levá-la para outra sala. Nesta pesquisa, no primeiro dia pós-natal os filhotes de ratos Wistar (machos e fêmeas) foram privados da mãe durante 3 horas por dia, nos primeiros 10 dias pós-natais. A privação consistiu em retirar a mãe da caixa, mantendo os filhotes para estes ficarem na presença do odor maternal. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na caixa original com sua mãe. As caixas em ambos

os grupos só foram trocados no 11º dia após o período pré-natal. Os ratos foram desmamados apenas no 21º dia após o período pré-natal e tanto machos, como fêmeas foram utilizados neste estudo.

4.4 PROCEDIMENTO DE EXPOSIÇÃO AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA)

Após o desmame os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: 1) controle (sem privação e sem EA); 2) privado sem EA; e 3) privado + EA. Para o procedimento de EA o grupo privado + EA foi exposto ao EA durante 3 horas diárias, por períodos distintos. Um grupo de animais foi exposto ao EA por 40 dias, outro grupo por 20 dias e um terceiro por 10 dias. Cada um desses grupos tiveram os grupos experimentais 1 (controle) e 2 (privado) para cada fase do desenvolvimento. Mais detalhes podem ser observados na figura 1. O ambiente enriquecido consistia em uma gaiola grande de 40 x 60 x 90 cm. Nas gaiolas de ambiente enriquecido ficaram expostos vários objetos como roda de corrida, escadas, tubos, cubos de lego, peças de madeira, itens de suspensão, dentre outros objetos. A cada semana, os objetos foram substituídos por novos de novidade sutil. Permaneceram em cada gaiola de EA 12 animais (Ickes et al., 2000). Alimento e água ficaram disponíveis durante todos os períodos em que os animais permaneceram nas gaiolas de EA. Quando atingiram 31, 41 e 61 dias de vida, foram retiradas as estruturas (córtex frontal e hipocampo) para dosagens de parâmetros epigenéticos.

Figura 1: Desenho experimental

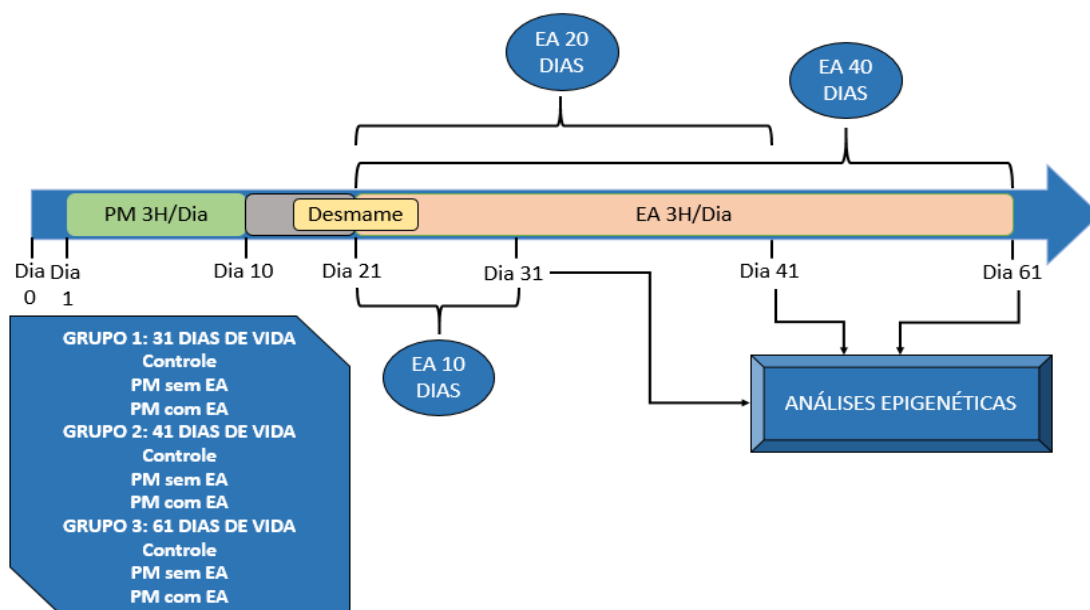


Figura 1: A privação materna (PM) foi realizada durante os 10 primeiros dias de vida (3h por dia). O desmame ocorreu no 21º dia após o nascimento. Diferentes grupos de ratos machos e fêmeas foram avaliados nos dias 31, 41 e 61 após o nascimento. O enriquecimento ambiental (EA) foi realizado durante 3h por dia. O grupo avaliado no dia 31 (n=8 para machos e n=8 para fêmeas por grupo) foi submetido ao EA por 10 dias, o grupo avaliado no dia 41 (n=8 para machos e n=8 para fêmeas por grupo) foi submetido ao EA por 20 dias e o grupo avaliado no dia 61 (n=8 para machos e n=8 para fêmeas por grupo) foi submetido ao EA por 40 dias. Em cada uma das fases do desenvolvimento, diferentes animais (machos e fêmeas) foram mortos, tendo sido retiradas as estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo para análises de parâmetros epigenéticos.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1 Avaliação da atividade das HDACs e das DNMTs

4.5.1.1 Extração nuclear

Primeiramente as áreas cerebrais, córtex frontal e hipocampo foram homogeneizadas em tampão de lise citoplasmático contendo ditioneitol (DTT) e inibidores da protease. A suspensão foi mantida em gelo durante 15 minutos e depois centrifugada a 250 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em dois volumes de tampão de lise citoplasmático frio. A suspensão foi homogeneizada utilizando uma seringa com a agulha de calibre pequeno e centrifugada em 8000 x g durante 20 min a 4 °C. O sedimento resultante obteve a porção nuclear da célula lisada. O sedimento foi ressuspenso em tampão de extração nuclear contendo inibidores de protease e DTT, e a suspensão foi homogeneizada com uma seringa com a agulha de calibre pequeno. A amostra resultante foi mantida em agitação lenta durante 30-60 min num agitador orbital, a 4 °C. Após, a suspensão nuclear foi centrifugada em 16000 x g durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante contendo o extrato nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -80 °C até análise posterior. O cálculo da atividade das HDACs ou das DNMTs foi realizado com base na curva padrão, e os valores foram apresentados em $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína.

4.5.1.2 Atividade das HDACs e das DNMTs

Os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para a avaliação da atividade das HDACs ou das DNMTs com o uso do kit de Ensaio de HDAC ou de DNMTs (detecção colorimétrica), de acordo com as instruções do fabricante (Upstate, EUA). Resumidamente, as amostras de extrato nuclear foram misturadas com tampão de ensaio de HDAC ou de DNMTs mais substrato de ensaio de HDAC ou de DNMTs em uma placa de 96 poços e incubadas a 30°C durante 45 min. Concomitantemente, uma curva padrão foi feita com diluições em série de substratos dos kits de HDAC ou de DNMT e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Após, a solução de ativador foi adicionada aos poços e, então, a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 15 min. A leitura colorimétrica foi realizada num leitor de placas de ELISA, com 400 nm para a atividade de HDACs e com 450 nm para a atividade de DNMT.

4.5.3 Dosagem de proteínas

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951), e albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram avaliadas utilizando SPSS Statistics 21.0 Software. Foi realizado ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de p menores que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA HDACS EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNA

A figura 2 mostra os resultados da atividade da HDAC em córtex frontal e hipocampo de ratos fêmeas que foram submetidos a privação materna no início da vida e expostos ao EA por diferentes tempos e estágios do desenvolvimento. Nas fêmeas de 31 dias, os quais foram expostas ao EA por 10 dias foi encontrado um aumento na atividade da HDAC no córtex frontal e no hipocampo do grupo que foi privado e se manteve elevada no grupo privado exposto ao EA ($p < 0,05$; Fig. 2A). Em fêmeas de 41 dias a atividade da HDAC aumentou no córtex frontal e no hipocampo no grupo privado ($p < 0,05$), comparado ao grupo controle. Porém, houve uma redução da atividade da HDAC no hipocampo do grupo exposto ao EA por 20 dias ($p < 0,05$; Fig. 2B). Tanto no córtex frontal quanto no hipocampo de ratas fêmeas privadas dos cuidados maternos com 61 dias foi encontrado um aumento na atividade da HDAC, comparado com o grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 2C). Por outro lado, EA por 40 dias foi capaz de reverter o aumento na atividade da HDAC, comparado ao grupo privado ($p < 0,05$; Fig. 2C).

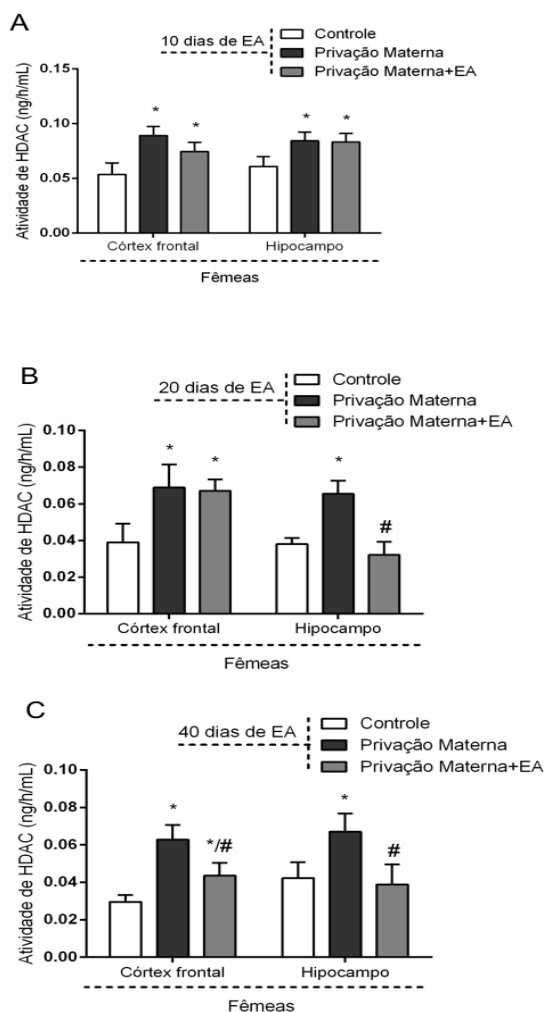


Figura 2: Efeitos do EA por 10 (A), 20 (B) e 40 (C) dias sob a atividade da HDAC no córtex frontal e hipocampo de ratos fêmeas submetidas à privação materna. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo privação materna.

5.2 EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA HDACS EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA

Os resultados referentes à atividade da HDAC em ratos machos privados dos cuidados maternos e expostos ao EA estão ilustrados na figura 3. No córtex frontal de machos com 31 e 41 dias não foram encontradas alterações na atividade da HDAC ($p > 0,05$; Fig. 3A e B). No entanto, no hipocampo a atividade da HDAC aumentou no grupo privado dos cuidados maternos e se manteve no grupo exposto ao EA por 10 ou 20 dias ($p < 0,05$; Fig. 3A e B), comparada com o grupo controle. Em ratos machos de 61 dias foi encontrada uma diminuição na atividade da HDAC no córtex frontal no grupo privado dos cuidados maternos e expostos ao EA por 40 dias ($p < 0,05$; Fig.

3C), comparada ao grupo controle. No hipocampo de ratos machos privados de 61 dias foi encontrado um aumento da HDAC, enquanto que no grupo exposto ao EA por 40 dias a atividade da HDAC se reduziu ($p < 0,05$; Fig. 3C).

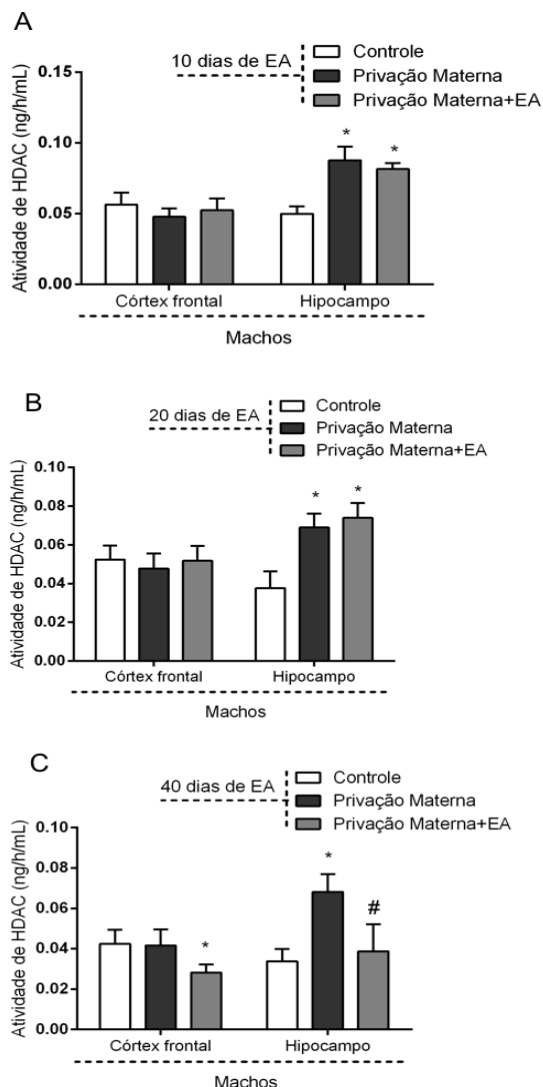


Figura 3: Efeitos do EA por 10 (A), 20 (B) e 40 (C) dias sob a atividade da HDAC no córtex frontal e hipocampo de ratos machos submetidos à privação materna. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo privação materna.

5.3 EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA DNMT EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNA

A figura 4 mostra a atividade da DNMT em ratos fêmeas submetidos a privação materna e expostos ao EA. Em fêmeas de 31 dias foi encontrado um aumento na atividade da DNMT quando submetidas à privação materna e nas expostas ao EA por

10 dias a atividade da DNMT manteve-se elevada, tanto no córtex frontal quanto no hipocampo ($p < 0,05$; Fig. 4A). Em fêmeas de 41 e 61 dias privadas dos cuidados maternos a atividade da DNMT aumentou no córtex frontal e no hipocampo. Porém, nos grupos expostos ao EA por 20 e 40 dias a atividade da DNMT foi diminuída em ambas as estruturas cerebrais ($p < 0,05$; Fig. 4B e C).

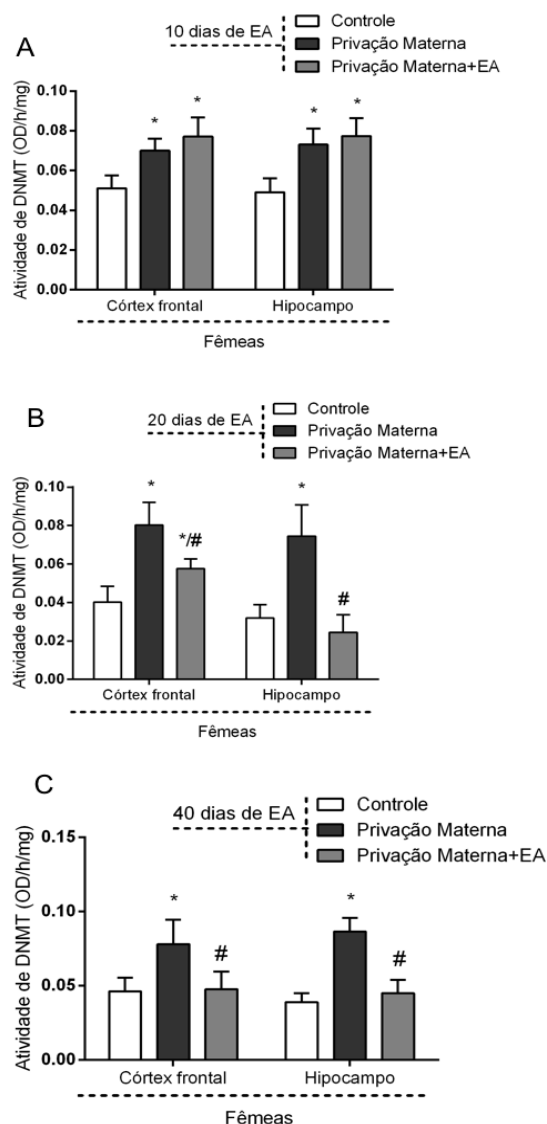


Figura 4: Efeitos do EA por 10 (A), 20 (B) e 40 (C) dias sob a atividade da DNMT no córtex frontal e hipocampo de ratos fêmeas submetidas à privação materna. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo privação materna.

5.4 EFEITOS DO EA SOB A ATIVIDADE DA DNMT EM CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA

A atividade da DNMT não se alterou no córtex frontal de ratos machos de 31 e 41 dias. Já no hipocampo ocorreu um aumento da atividade da DNMT nos animais expostos à privação materna e o EA por 10 ou 20 dias não foi capaz de reverter essa alteração, mantendo a atividade da DNMT elevada ($p < 0,05$; Fig. 5A e B). Em ratos machos de 61 dias privados dos cuidados maternos e expostos ao EA houve uma redução da DNMT no córtex frontal, comparada ao grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 5C). No hipocampo de ratos machos com 61 dias e submetidos à privação materna ocorreu um aumento na atividade da DNMT; porém, em animais que foram expostos ao EA por 40 dias a atividade da DNMT foi reduzida no hipocampo ($p < 0,05$; Fig. 5C).

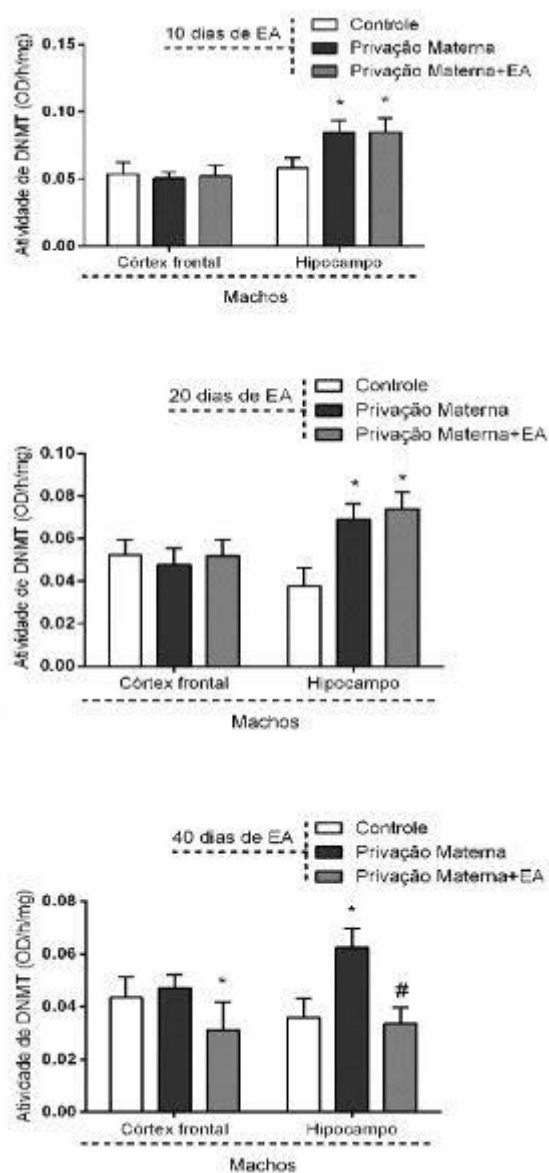


Figura 5: Efeitos do EA por 10 (A), 20 (B) e 40 (C) dias sob a atividade da DNMT no córtex frontal e hipocampo de ratos machos submetidos à privação materna. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo privação materna.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar os parâmetros epigenéticos em diferentes fases do desenvolvimento de ratos machos e fêmeas submetidos a privação materna e expostos ao EA. Os resultados mostraram que ratos machos e fêmeas expostos a privação materna apresentam alterações epigenéticas em diferentes fases do desenvolvimento e que um EA é capaz de reverter a maioria dessas alterações.

Para Zhu et al. (2019), fatores de risco ambiental similares foram implicados em diferentes distúrbios neuropsiquiátricos (incluindo as principais, doenças psiquiátricas e neurodegenerativas), indicando a existência de mecanismos epigenéticos comuns subjacentes à patogênese compartilhada por diferentes doenças. A privação materna (PM) no início da vida é conhecida por ser um estado estressante que pode levar a alterações neurocomportamentais permanentes e a um aumento da suscetibilidade a transtornos psiquiátricos, incluindo o TDM (AGID et al., 1999). Réus et al. (2013) e Réus et al. (2011), também afirmaram em seus estudos que o estresse precoce é um fator de risco proeminente para várias doenças psiquiátricas, incluindo o TDM e foi comprovado que a privação dos cuidados maternos durante os dez primeiros dias de vida em ratos machos induz um comportamento do tipo depressivo na vida adulta.

Para Nestler et al. (2015), o TDM é apenas 40% hereditário, fatores não genéticos estão associados à sua etiologia bem como sua terapêutica. O estresse nos primeiros dias de vida, principalmente com a separação materna, tem apresentado impactos mais amplos na epigenética e nos circuitos cerebrais, visto que o período pós-natal precoce é caracterizado pela considerável plasticidade do desenvolvimento do sistema nervoso (Abelaira et al, 2013). O desenvolvimento inicial marca uma época de mudanças dramáticas no cérebro, bem como maior suscetibilidade a muitos insultos ambientais. Mecanismos epigenéticos de regulação gênica são uma explicação particularmente atraente para como exposições precoces a estresse, toxinas e outros estímulos que exercem efeitos ao longo da vida sobre fenômenos neuropsiquiátricos (Kundakovic e Champagne 2015; Meaney 2001; Peña et al. 2014). Conforme Nestler et al. (2015), é fato que as exposições ao desenvolvimento podem ter um impacto mais amplo nos estados epigenéticos e nos circuitos cerebrais do que exposições semelhantes mais tarde na vida. Portanto, é importante, ao caracterizar

as contribuições epigenéticas para doenças mentais, realizar estudos ao longo do ciclo de vida.

Fica comprovado, então, que o estresse severo e prolongado é um dos principais fatores ambientais que leva ao aparecimento do TDM, ansiedade e disfunções cognitivas. Por outro lado, este estudo pode demonstrar que a exposição ao EA de ratos Wistar machos e fêmeas foi capaz de reverter alterações epigenética principalmente quando a exposição foi mais longa, 20 e 40 dias para fêmeas e 40 dias para machos. Shilpa et al. (2017) demonstraram que ratos estressados expostos ao EA tiveram uma redução no comportamento depressivo e ansioso, além de uma melhora na memória espacial.

Czamara et al. (2019), afirmam que os mecanismos epigenéticos podem permitir a integração de fatores genéticos e ambientais, o que pode levar a transtornos de humor e moldar a função celular. Com baixa adesão aos tratamentos farmacológicos dos pacientes com TDM (Krishnan; Nestler, 2008), este estudo pode comprovar que fatores ambientais podem reverter as alterações epigenéticas em diferentes fases do neurodesenvolvimento de ratos machos e fêmeas, principalmente em fêmeas, as quais foram mais suscetíveis ao estresse induzido por privação materna, sugerindo que um EA poderia ser uma alternativa terapêutica para o TDM, ou ainda, para potencializar os efeitos dos antidepressivos clássicos.

Como apresentado na introdução deste trabalho, a epigenética envolve três processos: a metilação de DNA, que consiste na adição covalente de um grupo metil na posição 5' para um resíduo citosina, através de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), reduzindo a transcrição genética (Jones e Takai, 2001); as modificações pós translacionais em proteínas histonas e alteração de RNA não codificante (RNAnc) (Lister et al., 2009; Lutz e Turecki, 2014). As alterações das histonas se dão principalmente pela enzima histona acetiltransferase (HAT), a qual adiciona grupos acetil, afrouxando a cromatina, facilitando a transição gênica, e histona deacetilase (HDAC), a qual remove os grupos de acetil de resíduos de lisina nas histonas, que influencia o nível de expressão do gene subjacente, pois HDAC provoca o empacotamento do DNA, reduzindo assim a transição gênica (Kuo e Allis, 1998).

Neste estudo foram analisados os efeitos do EA sob a atividade da HDAC e DNMT em córtex frontal e hipocampo de ratos fêmeas e machos em diferentes fases do desenvolvimento (31, 41 e 61 pós nascimento) aos quais foram submetidos à privação materna. Conforme resultados obtidos podem-se observar que as fêmeas

foram mais vulneráveis a alterações epigenéticas. De fato, transtorno de humor como o TDM e ansiedade, por exemplo, são mais prevalente em mulheres do que homens, sugerindo que alterações epigenéticas decorrentes de estressores ambientais poderiam estar relacionadas com a maior vulnerabilidade no sexo feminino.

No presente estudo alterações significativas foram encontradas em todas as fases do desenvolvimento, com aumento da atividade da HDAC e DNMT tanto no córtex frontal quanto hipocampo de fêmeas. Já os machos submetidos a privação materna tiveram alterações significativas no hipocampo, demonstrando que a privação materna durante o início da vida provoca alterações epigenéticas em diferentes fases do desenvolvimento, principalmente em ratos fêmeas, portanto como evidenciado na introdução os parâmetros epigenéticos são estáveis e o EA vem como uma proposta terapêutica para promover essas modificações estáveis da epigenética.

As atividades da HDAC e DNMT foram analisadas nos grupos de PM expostos ao EA por 10, 20 e 40 dias e os resultados também foram mais significativos em ratos fêmeas, porém mais evidentes quando expostas ao EA por períodos mais longos. A atividade da HDAC em fêmeas que passaram por protocolo de PM + EA foi reduzida com 20 e 40 dias de exposição ao EA quando comparadas ao grupo privado em hipocampo e no córtex frontal apenas com 40 dias de exposição ao EA. Os machos houve somente uma redução significativa com 40 dias de exposição ao EA. Para a atividade da DNMT os dados são basicamente iguais da atividade da HDAC em ambos os sexos, sendo que ratos fêmeas respondem melhor ao EA do que os machos na terapêutica do TDM, portanto as mesmas também são mais vulneráveis à alterações epigenéticas que podem ser moduladas para o TDM, quando comparadas ao grupo controle.

O EA tem apresentando bons efeitos na melhora de déficits cognitivos e comportamentos ansiosos, os quais são situações comuns em indivíduos com TDM. Assim o EA poderia ser uma boa estratégia para o tratamento do TDM, melhorando as alterações neurobiológicas induzidas pela privação materna, incluindo alterações epigenéticas (Nestler et al., 2015).

Covington et al. (2009) afirmaram que a administração sistêmica de inibidores de HDAC inespecífico (por exemplo, butirato de sódio) ou injeção direta de inibidores mais seletivos (por exemplo, MS275) em qualquer uma das regiões cerebrais, incluindo núcleo accumbens (NAc), hipocampo, amígdala ou córtex pré-frontal (PFC), alivia sintomas semelhantes à depressão em modelos animais de estresse social

crônico. Corroborando com os resultados do presente estudo, onde níveis reduzidos de HDAC em região de hipocampo e córtex frontal reduziram alterações epigenéticas moduladas para transtorno psiquiátrico como o TDM.

Ainda Covington et al. (2009), revelaram que a expressão gênica no NAc de camundongos estressados cronicamente que foram tratados sistemicamente com fluoxetina ou intra-NAc com MS275 demonstrou que ambos os tratamentos revertem uma grande proporção de expressão gênica diferencial induzida por estresse de derrota social. Além disso, o estudo revelou que cada tratamento também regulava subconjuntos de genes únicos, onde houve também sobreposição significativa, sugerindo que os efeitos do antidepressivo fluoxetina, em parte podem ser mediados por afetar a acetilação de histonas. A metilação da histona também está implicada na depressão. O estresse da derrota social crônica regula a histona metiltransferases G9a e proteína do tipo G9a, que catalisam H3K9me2, a qual está associada a inibição da transcrição de genes. Para Robison et al. (2013) a superexpressão de G9a e aumento do H3K9me2 em sítios promotores de genes específicos estão implicados no efeito antidepressivo da fluoxetina.

O estudo de Ignácio et al. (2017) teve como objetivo analisar o efeito do tratamento com quetiapina (20 mg/kg) no comportamento depressivo de ratos submetidos a PM, bem como a atividade de acetilação de histonas pela enzimas histona acetil transferases (HAT) e HDAC e metilação do DNA, através da enzima DNMT no CF, núcleo accumbens (NAc) e hipocampo. Os resultados afirmaram que o tratamento com antipsicóticos, como a quetiapina, exerce efeito terapêutico em ratos machos submetidos a PM e induz alterações epigenéticas. Este tratamento foi capaz de reverter o comportamento do tipo depressivo e reduziu a atividade da DNMT no hipocampo. Este foi o primeiro estudo a mostrar o efeito antidepressivo de quetiapina em animais submetidos à PM e um efeito protetor da quetiapina reduzindo as alterações epigenéticas induzidas pelo estresse no início da vida, reforçando um papel importante da quetiapina como terapia para o TDM.

Ignácio et al. (2014) indicam em seus estudos que tanto os eventos adversos no início quanto ao longo da vida interferem na epigenética e padrões epistáticos, direcionando respostas comportamentais que pode culminar no TDM. No entanto, o fenótipo depressivo também é fortemente afetado por suas características genéticas individuais e polimorfismos, os quais preveem diferenças nas variações epistáticas influenciadas pelo ambiente. A lista de moléculas que sofrem alterações epigenéticas

contêm os genes 5-HTT e BDNF. Outro fator importante que foi destacado é que as alterações epigenéticas ocorrem de maneira diferente, principalmente entre a amígdala, hipocampo e CF. Estas diferenças também resultam em plasticidade diferenciada, como respostas emocionais e cognitivas consistentes com diferentes regiões do cérebro, como aumento da ansiedade por ativação da amígdala, a depressão e a cognição as quais agem reduzindo as funções do hipocampo e do CF. Assim, os resultados desses processos epistáticos e epigenéticos estão também relacionados com hormônios do eixo HPA, que pode influenciar as mudanças na plasticidade e atividade funcional entre as diferentes regiões do cérebro (Ignácio et al., 2014).

As mudanças no eixo HPA são características da depressão. Este eixo exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos. Anormalidades na função do eixo HPA têm sido descritas em pessoas que experimentam transtornos psiquiátricos. Além disso, é bem conhecido o papel fundamental do estresse como precipitante de episódios de transtornos psiquiátricos em indivíduos predispostos. Essas anormalidades parecem estar relacionadas às mudanças na capacidade dos glicocorticóides circulantes em exercer seu *feedback* negativo na secreção dos hormônios do eixo HPA por meio da ligação aos receptores mineralocorticóides (RM) e glicocorticóides (RG) nos tecidos do eixo HPA (Juruena; Cleare e Pariante, 2004).

No estudo de Wikenius et al. (2019), foi levantada a hipótese de que a depressão pré-natal materna estaria associada à metilação do DNA infantil. Para o estudo foram coletadas amostras de salivas de 184 mulheres grávidas na região da Noruega. Os sintomas maternos depressivos foram classificados pela versão norueguesa através da Escala de Depressão Pós-natal de Edimburgo (EPDS). O tempo de inclusão foi da 17ª à 32ª semana gestacional. Algumas crianças tiveram avaliação 6 semanas antes do início da coleta da saliva, outros foram impedidas de comparecer a avaliação da coleta da saliva. O estudo demonstrou que os sintomas depressivos maternos pré-natais não estão associados à metilação do DNA infantil quando analisado separadamente em 6 semanas ou 12 meses, e também não foram significativos quando analisados os dois momentos juntos. Estes resultados não sustentam a hipótese de que o estresse materno pré-natal influencia a variação epigenética da prole, mas o estudo foi limitado por ter pouca capacidade e a falta de mulheres clinicamente deprimidas. Estes achados ilustram as dificuldades de estudar

possíveis associações entre emoções maternas pré-natais e metilação de DNA infantil.

Em contrapartida o estudo de Serpeloni et al. (2017), examinaram a hipótese multigeracional ou seja, as avós que foram expostas ao estresse psicossocial durante a gravidez, poderia afetar ou não a metilação do DNA dos netos. Foi determinado o perfil de metilação do DNA em todo o genoma de 121 crianças (65 meninas e 56 meninos) e testado as associações com a exposição a violência interpessoal da avó durante a gravidez. Neste estudo, pode-se observar que houve variações de metilação de cinco sítios de CpG associado ao relato de exposição da avó à violência durante a gravidez das mães das crianças. Os resultados revelaram a metilação diferencial de genes envolvidos nos processos do sistema circulatório e anomalias congênitas, como: CFTR (regulador de condutância transmembranar de fibrose cística) e CORIN (corina serina peptidase). Além disso, mudanças na metilação da CFTR foi previamente demonstrada em adolescentes permanentes em instituições para crianças órfãs e abandonadas com uma histórica adversidade. Também, foi demonstrado que a desregulação da CFTR afeta a liberação de vitamina D, o que pode estar relacionado com os sintomas de TDM.

O estudo de Zhu et al. (2019) conclui que fatores ambientais estão envolvidos na patogênese de distúrbios neuropsiquiátricos, e estes podem, sim, por meio da epigenética, alterar mecanismos que envolvam a expressão gênica. A metodologia desse estudo deu-se por meio de coortes de dados disponíveis ao público como de expressão e metilação do DNA de amostras de córtex pré-frontal *post-mortem* de 426 indivíduos (242 casos, 184 controles) e 823 indivíduos (406 casos, 417 controles), respectivamente.

Conforme Veena et al. (2009a, b), o estresse por imobilização crônica (CEI) resultou em comportamento do tipo depressivo e ansioso. Além disso, ratos expostos ao CEI exibiram comprometimento do aprendizado espacial e memória. No mesmo estudo os pesquisadores demonstraram que a exposição a um EA teve efeitos antidepressivos.

Além disso, Shilpa et al. (2017), afirmam em seus resultados que EA melhorou significativamente déficits de aprendizagem e memória além de ter ações antidepressivas e ansiolíticas em ratos estressados. Esses efeitos benéficos foram associados à restauração dos níveis de BDNF, VEGF, GFAP e GR no hipocampo e

córtex frontal. O estudo mostrou que o EA reverteu hipotrofia do giro dentado no hipocampo; no entanto, não foi capaz de restaurar hipertrofia da amígdala.

Para Nestler et al. (2015) ainda não existem estudos em humanos pós-morte até o momento, portanto nenhuma análise do genoma, referente as modificações das histonas no cérebro humano deprimido foram realizadas. Esta é uma alta prioridade para pesquisa futura. Porém, o presente estudo pode comprovar que o EA desempenha um papel fundamental na otimização e modificação do sistema neuronal e circuitos neuronais, estimulando estímulos sensoriais, motores e cognitivos, essencial para o desenvolvimento normal do cérebro em modelos animais de depressão, o que pode se relacionar com a modulação positiva das atividades da HDAC e DNMT como demonstradas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo pode evidenciar que o estresse no início da vida provocado pela privação materna apresenta alterações epigenéticas no desenvolvimento de ratos machos e fêmeas. A prole que foi privada dos cuidados maternos apresentou aumento nas atividades de HDAC e DNMT, porém, tais efeitos foram dependentes de sexo e período do desenvolvimento. Por outro lado, a prole exposta à privação materna, mas que foi submetida a um enriquecimento ambiental, principalmente pela exposição mais prolongada (40 dias) foi capaz de reverter o aumento dessas enzimas, com resultados mais significativos em ratos fêmeas. Com isso, fica evidente que uma das medidas terapêuticas para o TDM é a exposição crônica ao EA, sendo esta capaz de promover alterações em locos genômicos que controlam a expressão gênica.

Estudos futuros são sugeridos para uma melhor investigação dos mecanismos envolvidos com epigenética e TDM induzidas pelo estresse precoce. Além disso, o EA poderia ser considerado uma boa alternativa de tratamento não farmacológico ou coadjuvante aos antidepressivos clássicos.

8 REFERÊNCIAS

Abdallah CG. et al. Ketamine's mechanism of action: a path to rapid-acting antidepressants. *Depress Anxiety*. 2016 v. 33, n. 8, p. 689-97. ISSN 1091-4269.

Abelaira HM, Reus GZ, Neotti MV, Quevedo J. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Sciences*. 2014; 101:10–14.

Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Braz J Psychiatry*. 2013; 35:112–120, 2013.

Agid, O.; Shapira, B.; Zislin, J.; Ritsner, M.; Hanin, B.; Murad, H.; Troudart, T.; Bloch, M.; Heresco-Levy, U.; Lerer, B. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 1999; v. 4, p. 163-172.

Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?. *Int J Dev Neurosci*. 1998;16 (3-4): 149-166.

Barger SW, Basile AS. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cysteine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem*. 2001; 76:846–854.

Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, Beggs ML. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J Neurochem*. 2007; 101:1205–1213.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.*. 2006; 7(2):137–151.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.*. 2007; 8: 766-775.

Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S, Cui Y, Wang JF. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci. Lett.* 2015; 584: 208-13.

CORYELL, William; WINOKUR, George. Transtornos depressivos. In: *Manual MSD – Versão para profissionais de saúde*. 2019. Retrieved by <https://www.msdmanuals.com>. > Acesso em: 27 mai. 2019.

Covington HE, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, and others. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci.* 2009; 29:11451–60.

Czamara D. et al. Integrated analysis of environmental and genetic influences on cord blood DNA methylation in new-borns. *Nature Communications.* 2019; 10:2548

Dahl J, Ormstad H, Aass H. C, Malt UF, Bendz LT, Sandvik L, Brundin L, Andreassen OA. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 45:77-86.

Dalton VS, Kolshus E, Mcloughlin DM. Epigenetics and depression: return of the repressed. *J Affect Disord;* 155: 1-12.

De Kloet, ER, Vreugdenhil, E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 1998; 19: 269-301.

Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry.* 2006; 61(6): 7-11.

Drevets WC, Price JL, Simpson JR, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature.* 1997; 386: 824-827.

Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Bio Psy*. 1999; 46:1181-1191.

Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman R, Flaxman AD, Patten SB, et al. The epidemiological modelling of major depressive disorder: application for the Global Burden of Disease Study. *PLoS ONE*. 2010; 2013; 8(7): 1-14.

Ferrari AJ, Somerville AJ, Baxter AJ, Norman R, Patten SB. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med*. 2013; 43: 471- 481.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 47: 61-68.

Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222(3): 236-245.

Fujii RK, Goren A, Annunziata K, Mould-Quevedo J. Prevalence, awareness, treatment, and burden of major depressive disorder: estimates from the national health and wellness survey in brazil. *Value Health Reg Issues*. 2012; 1(2): 235-243.

Gardner A, Salmaso D, Nardo D, Micucci F, Nobili F, Sanchez-Crespo A. Mitochondrial function is related to alterations at brain SPECT in depressed patients. *CNS Spectrus*. 2008; 13:805-14.

Haller J, Harold G, Sandi C, Neumann ID. Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans. *J Neuroendocrinol*. 2014; 26: 724-738.

Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, De Moura AB, Matos D, Demo JP, Da Silva JB, Gava FF, Valvassori SS, Carvalho AF, Quevedo J. Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. *Behav Brain Res*. 2017; 320: 225-232.

Jones P, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001; 293: 1068–1070.

Juruena MF, Clearea AJ e Pariantea CM. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr* 2004; 26(3):189-201

Kaplow JB, Widom CS. Age of onset of child maltreatment predicts long-term mental health outcomes. *J Abnorm Psychol*. 2007; 116:176–187.

Kinnally EL, Capitanio JP, Leibel R, Deng L, LeDuc C, Haghighi F, Mann JJ. Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques. *Genes Brain Behav*. 2010; 9: 575-582.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128: 693-705.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008; 455:894-902.

Kundakovic M, Gudsnuk K, Herbstman JB, Tang D, Champagne FA. DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:6807–13.

Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bio Essays*. 1998; 20(8): 615–626.

Levine S, Chevalier JA, Korchin SJ. The effects of early shock and handling on later avoidance learning. *J Pers*. 1956; 24: 475-493.

Lutz PE, Turecki G. DNA methylation and childhood maltreatment: from animal models to human studies. *Neuroscience*. 2014; 264: 142-156.

Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacol.* 2001; 24: 420-9.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35: 676-692.

Magarinos AM, Deslandes A, Mcewen B. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol.* 1999; 371:113-22.

Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2009; 1789(1): 58-68.

McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci.* 2009; 12(3): 342-348.

Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:1161–92.

Menard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ. Immune and neuroendocrine mechanisms of stress vulnerability and resilience. *Neuropsychopharmacol.* 2017; 42:62-80.

Miller AH. Conceptual confluence: the kynurenine pathway as a common target for ketamine and the convergence of the inflammation and glutamate hypotheses of depression. *Neuropsychopharmacol.* 2013; 38:1607–1608.

Mocking RJ, Nap TS, Westerink AM, Assies J, Vaz FM, Koeter MW, Ruhe HG, Schene AH. Biological profiling of prospective antidepressant response in major

depressive disorder: associations with (neuro)inflammation, fatty acid metabolism, and amygdala-reactivity. *Psychoneuroendocrinol* . 2017; 79:84-92.

Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry*. 2013; 18(5): 595-606.

Nanni V, Uher R, Danese A. Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: a meta analysis. *American Psychiatric Association*. 2012; 169(2): 141-51.

Nestler EJ, Pena CJ, Kundakovic M, Mitchell, Akbarian S. Epigenetic basis of mental illness. *Neuroscientist*. 2015; 1-16.

Nestler EJ, Barro TM, Dileone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002; 34:13–25.

O'Brien SM, Scully P, Fitzgerald P, Scott LV, Dinan TG. Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *J Psychiatry*. 2007; 41:326–331.

Peña CJ, Bagot RC, Labonté B, Nestler EJ. Epigenetic signaling in psychiatric disorders. *J Mol Biol*. 2014; 426: 3389–412

Pianl D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol*. 1992; 22:2429–2436.

Renthal W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*. 2008; 14(8): 341-50.

Réus GZ, Abelaira HM, Santos MAB, Carlessi AS, Tomaz DB, Neottia MV, Liranc,o JLG, Gubertb C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the

nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res.* 2013; 256: 451-456.

Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience.* 2015c; 300: 141-154.

Réus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* 2015; 68: 316-328.

Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, De Souza TG, Abelaira HM, Carneiro C, Wendhausen D, Michels M, Pescador B, Dal-Pizzol F, Macêdo DS, Quevedo, J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res.* 2017; 95: 196-207.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal Deprivation Induces Depressive-like Behaviour and Alters Neurotrophin Levels in the Rat Brain. *Neurochem Res.* 2011; 36: 460-466.

Rezin GT, Cardoso MR, Gonçalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of ratssubjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int.* 2008; 53:395-400.

Robison AJ, Vialou V, Sun HS, Labonte B, Golden S, Dias C, and others. Fluoxetine epigenetically alters the CaMKII α promoter in nucleus accumbens to regulate FosB binding and antidepressant effects. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 39:1178–86.

Sapolsky RM. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress.* 1996; 1:1-19.

Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29:201–217.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The journal of Neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 1965; 7(4): 524-533.

Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Ver Nutri* 2004; 17(2): 227-236.

Shilpa BM, Bhagya V, Harish G, Srinivas Bharath MM, Shankaranarayana Rao, BS. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 76: 88-100.

Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.*, 2011; 572634.

Smith L, Heiervang ER, Undlien DE e LeBlanc M. Prenatal maternal depressive symptoms and infant DNA methylation: a longitudinal epigenome-wide study. *Nordic Journal of Psychiatry*. 2019; ISSN: 0803-9488 (Print) 1502-4725

Song C, Halbreich U, Han C, Leonard BE, Luo H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed atients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2009; 42:182–188.

Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013; 26:19–26.

Streck EL, Gonçalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F, Quevedo, J. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. *Braz J Psychiatry*. 2014; 36:156–167.

Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, Walker FR. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2013; 126:75–91.

Ustun TB, Ayuso–Mateos JL, Chatterji S, Mathers C, Murray CJL. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Braz J Psychiatry.* 2004; 184(5): 386–92.

Ustun TB, Chatterji S. Global burden of depressive disorders and projections. In: Dawson A, Tylee A, eds. *Depression: social and economic timebomb.* London: BMJ Books, 2001; 31-43.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol;* 39:44–84.

Veena, J., Srikumar, B.N., Mahati, K., Bhagya, V., Raju, T.R., Shankaranarayana Rao, B.S. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *J. Neurosci. Res.* 2009a; 87, 831–843.

Veena, J., Srikumar, B.N., Raju, T.R., Shankaranarayana Rao, B.S. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. *Neurosci. Lett.* 2009b; 455, 178–182.

Verduijn J, Milaneschi Y, Schoevers RA, Van Hemert AM, Beekman AT, Penninx, BW. Pathophysiology of major depressive disorder: mechanisms involved in etiology are not associated with clinical progression. *Transl Psychiatry.* 2015; 5: e 649.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004; 7(8): 847-54.

Wikenius E, Myhrea AM, Pagec CM, Moe V, Smithe L, Heiervanga ER, Undliena DE e LeBlanc M. Prenatal maternal depressive symptoms and infant DNA methylation: a longitudinal epigenome-wide study. *Nordic Journal Of Psychiatry*. 2019, VOL. 73, NOS. 4–5, 257–263.

Williams LM, Debattista C, Duchemin AM, Schatzberg AF, Nemeroff CB. Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. *Transl Psychiatry*. 2016; 6: 1-7.

Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999; 286(5439): 481-486.

World Health Organization. Depression. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>> Acesso em: 27 mai. 2019.

Xanthos DN, Sandkuhler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15:43–53.

Zhang Y, Wang Y, Wang L, Bai M, Zhang X, Zhu X. Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015; 18(8): 1–10.

Zhu k., Tai-Hsien Ou Yang, Dorie V., Zheng T e Anastassiou D. Meta-analysis of expression and methylation signatures indicates a stress-related epigenetic mechanism in multiple neuropsychiatric disorders. *Translational Psychiatry*. 2019; 9:32.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I - CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DO CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **31/07/2018**.

Título do projeto	Investigação de alterações epigenéticas em diferentes fases do desenvolvimento de roedores expostos a privação materna e ao enriquecimento ambiental
Project title	Investigation of epigenetic changes in different stages of development of rodents exposed to maternal deprivation and environmental enrichment
Número do protocolo Protocol number	070/2018-1 – Versão 03
Pesquisador principal Principal Investigator	SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Pesquisadores Researchers	Camilla Marques Luz, Danyela Matos, Ana Caroline Darabas Motta, Gislaine Zilli Réus, Helena Mendes Abelaira, João Paulo Behenck, Júlia Possamai Demo, Laura de Araujo Borba, Thays Guimarães de Souza.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/08/2018 a 01/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
No de animais	144
Idade/Peso	1 a 61 dia dias / 50 – 350g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 31 de julho de 2018.

Vilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA